

Priority number(s): DE20021000541 20020109



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 102 00 541 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
B 01 L 3/00
C 12 M 1/18
C 12 Q 1/02

⑳ Aktenzeichen: 102 00 541.9
㉔ Anmeldetag: 9. 1. 2002
㉕ Offenlegungstag: 24. 7. 2003

DE 102 00 541 A 1

㉑ Anmelder:
Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, DE

㉒ Vertreter:
Dr. Werner Geyer, Klaus Fehners & Partner GbR,
80687 München

㉓ Erfinder:
Neumann, Tobias, Dr., 07743 Jena, DE

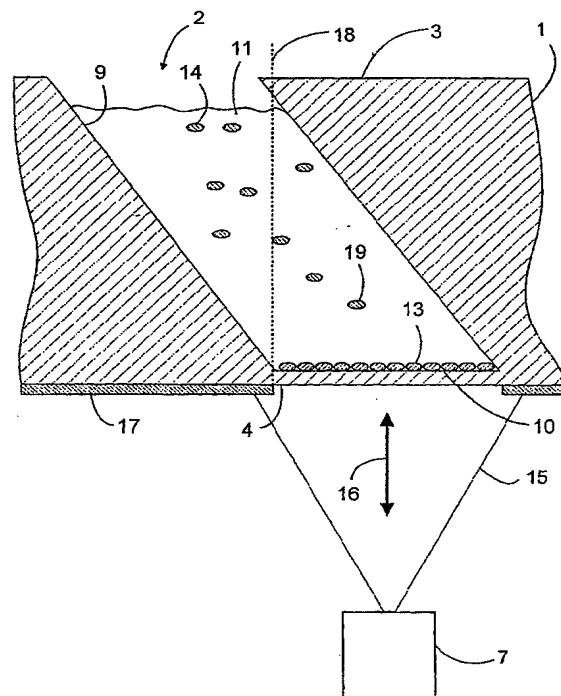
㉔ Entgegenhaltungen:
DE 39 15 920 A1
DE 200 09 620 U1
US 60 74 614
US 59 85 217
US 58 69 002
WO 99 56 877 A1
WO 01 96 019 A1
WO 01 90 726 A2
WO 01 41 929 A1
WO 00 20 117 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

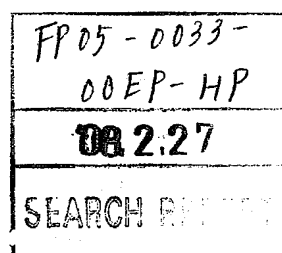
Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉕ Mikrotiterplatte

㉖ Bei der Mikrotiterplatte (1) mit einer Oberseite (3), einer gegenüberliegenden ebenen Unterseite (4) und mehreren in die Oberseite (3) eingelassenen Vertiefungen (2), die von Wandungen (9) und jeweils einem Boden (10) begrenzt werden, ist vorgesehen, die Wandungen (9) der Vertiefungen (2) mindestens abschnittsweise unter einem Winkel ungleich 90° zur Ebene der Unterseite (4) verlaufen zu lassen, um eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erreichen zu können.



DE 102 00 541 A 1



[0001] Die Erfindung bezieht sich auf eine Mikrotiterplatte mit einer Oberseite, einer gegenüberliegenden ebenen Unterseite und mehreren in die Oberseite eingelassenen Vertiefungen, die von Wandungen und jeweils einem Boden begrenzt werden.

[0002] Solche Mikrotiterplatten werden in der chemisch/biologischen Analysetechnik häufig verwendet. Dabei werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte Substanzen eingebracht, von denen physikalische Eigenschaften, meist zeitaufgelöst erfaßt werden. Eine besonders häufige Verwendung von Mikrotiterplatten sieht vor, am Boden der Vertiefungen präparierte Zellkulturen auszubringen, die dann am Boden anhaften. Diese Zellkulturen können dann z. B. mit Fluoreszenzmessungen analysiert werden.

[0003] Fluoreszenzmessungen werden für eine Vielzahl von Analysen verwendet. Dabei wird eine Probe bei einer ersten Wellenlänge bestrahlt und zur Emission von Strahlung bei einer zweiten Wellenlänge angeregt. Das emittierte Spektrum kann hinsichtlich Wellenlängenverteilung und Intensität Aussagen über die Zusammensetzung, Konzentration o. ä. der untersuchten Substanz bieten.

[0004] Die an den Vertiefungsböden haftenden Zellen werden zur Fluoreszenzanalyse mit einer Fluorophore enthaltenden Lösung in Kontakt gebracht, indem diese in die Vertiefungen gefüllt wird. Die Rate, mit der die Zellen die Fluorophore aufnehmen können, erlaubt Aussagen über verschiedene physiologische Eigenschaften der Zellen, beispielsweise die K^+ -Kanalaktivität. Somit ist die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung ein Maß für Eigenschaften der untersuchten Zelle. Solche Fluoreszenzanalysen sind in der pharmazeutischen Industrie von erheblicher Bedeutung und werden häufig auch für Reihenuntersuchungen großer Probenzahlen eingesetzt.

[0005] Die Mikrotiterplatte wird zur Messung also mit Strahlung beaufschlagt und das dadurch angeregte Fluoreszenzlicht für jede Vertiefung zeitaufgelöst erfaßt. Die Fluoreszenztätigkeit in einer Vertiefung ist dann ein Maß für das Eindringen der Fluorophore in die Zelle und somit charakterisierend für diese.

[0006] Ein Problem bei diesem Verfahren besteht allerdings darin, daß stets auch Fluorophore in der Lösung verbleiben, die über der am Boden der Vertiefung liegenden Zellschicht steht. Die Anregung bzw. Auslesung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt deshalb regelmäßig von der Unterseite der Mikrotiterplatte her, um den Beitrag der in der überstehenden Lösung befindlichen Fluorophore zur emittierten Fluoreszenzstrahlung möglichst gering zu halten. Die Unterseite der Mikrotiterplatte ist deshalb zumindest im Bereich der Böden der Vertiefungen regelmäßig transmittierend für die Anregungsstrahlung sowie für die Fluoreszenzstrahlung ausgebildet.

[0007] Da jedoch die an den Vertiefungsböden anhaftenden Zellschichten die Anregungsstrahlung immer zu einem gewissen Anteil transmittieren, läßt sich auch bei Anregung bzw. Detektion von der Unterseite einer Mikrotiterplatte her ein gewisser Meßhintergrund, der durch Fluoreszenzstrahlung verursacht wird, die von in der überstehenden Lösung befindlichen Fluorophore herrührt, nicht vermeiden.

[0008] Der Störhintergrund kann schließlich noch dadurch reduziert werden, daß durch Spül- und Waschvorgänge aus der überstehenden Lösung Fluorophore abgezogen werden. Dies erfordert jedoch eine oftmals recht umfangreiche und im übrigen auch fehlerträchtige Prozessierung der Mikrotiterplatte nach dem Befüllen der Vertiefungen. Insbesondere bei stark zeitabhängigen Reaktionen der Zellen mit der eingefüllten Lösung ist dies unerwünscht, ebenso, wenn eine

Vielzahl von Proben mit geringem Personalaufwand bewältigt werden soll.

[0009] Die US 5.355.215 beschreibt als Abhilfemaßnahme, die Fluoreszenzstrahlung von den Böden der Vertiefungen mittels einer abbildenden Optik aufzunehmen, die eine geringe Tiefenschärfe aufweist, so daß Strahlung aus der überstehenden Lösung weniger zum Meßsignal beiträgt. Diesen Vorteil erkaufte man sich allerdings durch eine starke Vergrößerung der Meßdauer, da es dann meist nicht mehr möglich ist, mehrere oder gar alle Vertiefungen einer Mikrotiterplatte in einem Schritt zu vermessen.

[0010] US 5.355.215 schlägt deshalb vor, die Unterseite der Mikrotiterplatte schräg zu beleuchten, um zu erreichen, daß die überstehende Lösung nur teilweise von Anregungsstrahlung durchdrungen und somit auch nur teilweise zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt wird. Alternativ erwähnt die US 5.355.215, daß die Fluoreszenzstrahlung schräg zur Unterseite der Mikrotiterplatte detektiert werden kann, da dies den gleichen Effekt habe, daß nur ein Teil der überstehenden Lösung zu einem störenden Meßhintergrund beitragen könne.

[0011] Das Konzept der US 5.355.215 erfordert jedoch ein spezielles Auslesegerät, bei dem Bestrahlung der Mikrotiterplatte und/oder Aufnahme von Fluoreszenzstrahlung von der Mikrotiterplatte schräg zur Unterseite der Mikrotiterplatte erfolgen muß. Wegen des damit verbundenen Aufwandes sind diese Geräte teurer als herkömmliche, weit verbreitete Auslesegeräte mit senkrecht zur Unterseite der Mikrotiterplatte erfolgender Anregung und Detektion.

[0012] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Mikrotiterplatte zu schaffen, die mit einfachen konstruktiven Mitteln Fluoreszenzmessungen mit geringem Störhintergrund ermöglicht.

[0013] Diese Aufgabe wird bei der eingangs geschilderten Mikrotiterplatte dadurch gelöst, daß von der Oberseite in Richtung auf den Boden gesehen jede Vertiefung mindestens abschnittsweise eine oder mehrere Hinterschneidungen aufweist.

[0014] Die erfindungsgemäße Mikrotiterplatte erreicht durch verblüffend einfache Maßnahmen, daß auch bei herkömmlicher Beleuchtung und Detektion der Mikrotiterplatte senkrecht zur Unterseite nur ein Teil der überstehenden Lösung von Anregungsstrahlung durchsetzt wird bzw. Fluoreszenzstrahlung zur Detektoreinheit hin abgibt. Der Störhintergrund ist somit auch bei Verwendung konventioneller Auslesegeräte stark vermindert.

[0015] Die Hinterschneidung bewirkt, daß die Anregungsstrahlung nicht ausschließlich Vertiefungsvolumen durchdringt, sondern auch Plattenmaterial in dem naturgemäß keine Fluoreszenz stattfindet. Der Störhintergrund ist damit um den Anteil, den das Plattenmaterial am durchstrahlten Volumen über dem Boden hat, reduziert.

[0016] Die genaue Ausbildung der Wandung(en), die den Innenraum der Vertiefungen begrenzt(en), kann bei der erfindungsgemäßen Mikrotiterplatte auf vielfältige Art und Weise erfolgen, solange sichergestellt ist, daß bei üblicherweise senkrecht auf die Unterseite einfallender Anregungsstrahlung der Innenraum der Vertiefungen nur teilweise so von der Anregungsstrahlung durchdrungen wird, daß der Boden vollständig bestrahlt ist und sich oberhalb des Bodens nicht ausschließlich Vertiefungsvolumen befindet, sondern auch Mikrotiterplattenmaterial.

[0017] Die Unterseite sollte dabei die Festlegung einer Bezugsrichtung ermöglichen. Diese wird regelmäßig mit der Beleuchtungsrichtung herkömmlicher Auswertegeräte zusammenfallen. Es kommt dabei nicht auf absolute Planarität der Unterseite an, sondern auf die Möglichkeit, eine Bezugsebene festzulegen. Diese kann beispielsweise durch

eine Auflageebene gegeben sein, auf die die Mikrotiterplatte im Auswertegerät aufgelegt wird.

[0018] Dies schließt nicht aus, daß die Unterseite ihrerseits strukturiert ist. So können beispielsweise in die Unterseite Vertiefungen eingearbeitet sein, die dazu dienen, die Mikrotiterplatte in einem Lesegerät geeignet auszurichten. Auch ist es möglich, an der Unterseite Prismenstrukturen anzuordnen, die dafür sorgen, daß auch Anregungsstrahlung, die nicht im Bereich eines Bodens auf die Unterseite trifft, in eine Vertiefung eingekoppelt werden. Dadurch wird ein höherer Grad der Anregung und damit eine größere Empfindlichkeit der Messung erreicht.

[0019] Zweckmäßigerweise wird man, der einfachen Fertigung wegen, beispielsweise den Innenraum der Vertiefungen zumindest abschnittsweise zylindrisch ausgestalten, wobei die Zylindermittelachse nicht senkrecht zur Ebene der Unterseite verläuft. Der Begriff Zylinder bzw. zylindrisch wird dabei im mathematischen Sinne verstanden (vgl. Bronstein, Taschenbuch der Mathematik", Verlag Harn Deutsch). Es bieten sich besonders kreisförmige Zylinderquerschnitte an, da diese durch einfache Bohrungen oder Abformvorgänge gewonnen werden können. Es ist deshalb eine Mikrotiterplatte zu bevorzugen, die Vertiefungen aufweist, deren Innenraum zumindest abschnittsweise zylindrisch ist, insbesondere die Form eines Kreiszylinders hat. Bei einer planparallelen Mikrotiterplatte kann man dem Vertiefungsinnenraum jeweils die Form eines beidseitig schräg abgeschnittenen Kreiszylinders geben, wobei die eine Schnittfläche dem Boden und die andere der an der Oberseite liegenden Öffnung der Vertiefung entspricht.

[0020] Das erfindungsgemäße Konzept kann aber auch mit Vertiefungen verwirklicht werden, die zylindrische Bereiche aufweisen, welche eine senkrecht zur Ebene der Unterseite verlaufende Zylindermittelachse aufweisen. Dazu werden die zylindrischen Bereiche übereinanderliegend und mit zueinander versetzten Zylindermittelachsen angeordnet. Dadurch wird erreicht, daß die Wandung eine Hinterschneidung in Form einer Stufe bildet, die über den Boden übersteht. Oberhalb der Stufe befindet sich keine anregbare Lösung. Somit kann aus diesem Bereich keine störende Fluoreszenzstrahlung emittiert werden, und es ist das erfinderische Konzept verwirklicht, daß Teilvolumina der Vertiefung nicht über dem Boden liegen, oder daß über dem Boden teilweise Mikrotiterplattenmaterial liegt.

[0021] Mit der erfindungsgemäßen Mikrotiterplatte ist erreicht, daß diejenigen Volumenbereiche einer Vertiefung, die senkrecht zur Unterseite gesehen nicht über dem Vertiefungsboden liegen, keine Fluoreszenzstrahlung als Störhintergrund abgeben. Vorzugsweise wird diese Wirkung noch verstärkt, wenn die Vertiefungen von der Unterseite der Mikrotiterplatte nur in ihrem Bodenbereich Anregungsstrahlung empfangen können. Dies kann durch vielfältige geeignete Maßnahmen gewährleistet werden. Beispielsweise kann das Material der Mikrotiterplatte so gewählt werden, daß es im allgemeinen Anregungs- und/oder Fluoreszenzstrahlung absorbiert, wobei natürlich im Bodenbereich der Vertiefungen, d. h. zwischen Boden und Unterseite gute Transmissionseigenschaften für Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung gegeben sein müssen. Optional kann auch bei einem Lesegerät eine entsprechende Blendenanordnung vorgesehen werden, die die Mikrotiterplatte so mit Strahlung beaufschlagt bzw. so Fluoreszenzstrahlung detektiert, daß nur der Bodenbereich der Vertiefungen bestrahlt bzw. abgefühlt wird.

[0022] Besonders einfach zu realisieren ist eine Weiterbildung der Mikrotiterplatte, die durch eine an der Unterseite der Mikrotiterplatte aufgebraute Maske selbst dafür sorgt, daß nur der Bodenbereich der Vertiefungen für Anregungs-

strahlung bzw. Fluoreszenzstrahlung zugänglich ist. Es ist deshalb eine Ausgestaltung zu bevorzugen, die eine an der Unterseite angebrachte Maske aufweist, welche im Bereich der Böden der Vertiefungen strahlungsmittierend ist. Alternativ kann das Mikrotiterplattenmaterial auch bis auf den Bereich zwischen Boden und Unterseite absorbierend für Anregungsstrahlung und/oder Fluoreszenzstrahlung sein.

[0023] In einer besonders einfachen Ausgestaltung stellt die Maske eine dünne auf die Unterseite aufgebraute Metallisierungsschicht dar, die im Bereich der Böden geeignete Aussparungen aufweist. Der gleiche Effekt wird erreicht, wenn die Wandung der Mikrotiterplatte, nicht jedoch der Bodenbereich, nicht transparent für Anregungs- und/oder Fluoreszenzstrahlung ist. Dies kann beispielsweise durch eine geeignete Beschichtung der Wandung jeder Vertiefung erreicht werden. Auch ist es möglich, die Wandung aufzu- rauhen, da dann durch eine Streuung der Fluoreszenzstrahlung nur noch ein stark verminderter Anteil bei der Detektion erfaßbar ist.

[0024] Die Unterdrückung des Störhintergrundes ist um so größer, je weniger Volumen der Vertiefungen senkrecht zur Ebene der Unterseite gesehen über dem Vertiefungsboden liegt. Mit anderen Worten, die erfindungsgemäße Mikrotiterplatte erlaubt die Unterdrückung des Störhintergrundes um so stärker, je weniger Volumen zur Aufnahme von Lösung senkrecht über dem Boden zur Verfügung steht. Es ist deshalb zu bevorzugen, daß jede Vertiefung sich längs einer Achse erstreckt, die unter einem Winkel zwischen 10° und 80° zur Ebene der Unterseite liegt. Dabei ergeben kleinere Winkelwerte eine stärkere Störhintergrundunterdrückung.

[0025] Mikrotiterplatten werden oftmals unter Verwendung von Automaten befüllt. Diese fordern meist eine bestimmte Lage der Öffnungen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte auf der Oberseite. Bedingt durch einen schrägen Wandungsabschnitt kann es nun auftreten, daß die Öffnungen der Mikrotiterplatte nicht an den Stellen liegen würden, an denen Befüllautomaten eine Öffnung erwarten. Für solche Fälle ist es äußerst zweckmäßig, wenn die auf der Oberseite befindlichen Öffnungen über den sich über den Böden befinden, wobei als Bezugsrichtung die Senkrechte zur Unterseitenebene anzusehen ist. Die Vertiefungen weisen dann z. B. Hinterschneidungen in Form aneinandergrenzender, gegenläufig schräg verlaufender Wandungsabschnitte auf. Es kann aber auch aus Fertigungsgründen zu bevorzugen sein, daß die in der Oberfläche gebildeten Öffnungen jeder Vertiefung senkrecht zur Ebene der Unterseite gesehen über den jeweils zugeordneten Böden liegen.

[0026] Bei der Herstellung der Mikrotiterplatte kann es auch zweckmäßig sein, einen keilförmigen Grundkörper zu verwenden, in dem senkrecht zur Ebene der Oberfläche die Vertiefungen eingearbeitet werden. Durch die Keilform des Grundkörpers verlaufen die Vertiefungen dann schräg zur Ebene der Unterseite, wobei der Keilwinkel dann der Winkel ist, um den eine Abweichung von der Senkrechten gegeben ist.

[0027] Direkt senkrecht (bezogen auf die Ebene der Unterseite) über dem Boden einer Vertiefung stehende Lösung trägt zu einem Störhintergrund bei einer Fluoreszenzmessung bei. Um das Volumen solcher Lösungsanteile möglichst gering zu halten, ist es zu bevorzugen, daß die Vertiefungen jeweils einen unter einem Winkel ungleich 90° zur Ebene der Unterseite verlaufenden Wandungsabschnitt aufweisen, der direkt an den jeweiligen Boden der Vertiefung angrenzt. Durch eine derartige Ausbildung der Vertiefung, die beispielsweise von der Öffnung her gesehen einen senkrecht zur Ebene verlaufenden Wandungsabschnitt und einen daran unmittelbar anschließenden schräg verlaufenden

Wandungsabschnitt bestehen kann, ist eine maximale Stör-
signalunterdrückung möglich.

[0028] Die Erfindung wird nachfolgend beispielhalber anhand der Zeichnungen noch näher erläutert. In den Zeichnungen, deren Offenbarung hier explizit eingebunden wird, zeigt:

[0029] Fig. 1 eine perspektivische Darstellung einer Mikrotiterplatte in einem Lesegerät,

[0030] Fig. 2 eine Ausschnittdarstellung einer Mikrotiterplatte nach dem Stand der Technik in einem Lesegerät,

[0031] Fig. 3 eine Schnittdarstellung einer Mikrotiterplatte in einem Lesegerät, die schräg zur Ebene der Unterseite verlaufende Wandungen hat,

[0032] Fig. 4 eine teilweise Schnittdarstellung der Mikrotiterplatte der Fig. 3 in einem Lesegerät, bei dem die Beleuchtung und die Detektion schräg zur Ebene der Unterseite erfolgt,

[0033] Fig. 5 eine Schnittdarstellung einer Mikrotiterplatte mit einem stufenförmigen Vertiefungsvolumen,

[0034] Fig. 6 eine detailliertere Darstellung des in den Fig. 3 und 4 schematisch dargestellten Auslesegerätes und

[0035] Fig. 7 bis 22 Schemadarstellungen weiterer möglicher Vertiefungsformen für eine Mikrotiterplatte.

[0036] In Fig. 1 ist eine Mikrotiterplatte 1 dargestellt, die Vertiefungen 2 aufweist, die in die Oberseite 3 der Mikrotiterplatte eingearbeitet sind. Im Ausführungsbeispiel der Fig. 1 sind 40 Vertiefungen vorgesehen, es kann jedoch auch eine andere Anzahl verwendet werden, beispielsweise 96, 384 oder 1536. Die Vertiefungen 2 haben jeweils kreisförmigen Querschnitt mit einem Durchmesser von etwa 5 mm. Sie enden in einem Boden, an dem zu untersuchende Zellen angeheftet werden, beispielsweise mit Hilfe von Polylysin oder anderen biochemischen Methoden befestigt. Näheres dazu findet sich beispielsweise in den Patentdokumenten US 4.343.782, US 4.835.103 oder WO 90/15317, auf die diesbezüglich vollumfänglich verwiesen wird.

[0037] Um die Fluoreszenzeigenschaften der in den Vertiefungen 2 der Mikrotiterplatte 1 befindlichen Zellen zu messen, wird diese mit ihrer Unterseite 4 auf ein Lesegerät 5 gelegt, das einen Rahmen 6 aufweist, der die Mikrotiterplatte 1 an der Unterseite 4 abstützt. Dabei läßt der Rahmen 6 die Unterseite 4 im Bereich der darüberliegenden Vertiefungen 2 frei.

[0038] Das Lesegerät 5 weist eine Anregungs- und Detektionseinheit 7 auf, die die Unterseite 4 mit Licht einer ersten Wellenlänge bestrahlt. Die Anregungs- und Detektionseinheit 7 weist dabei vorzugsweise einen Laser auf, dessen Strahl geeignet aufgeweitet ist. Das Licht regt die in den Vertiefungen liegenden Zellen der Emission von Fluoreszenzstrahlung bei einer zweiten Wellenlänge an, die für jede Vertiefung zeitaufgelöst erfaßt wird. Als Detektor in der Anregungs- und Detektionseinheit 7 fungiert dazu ein CCD-Empfänger. Die Anregungs- und Detektionseinheit 7 wird später noch anhand der Fig. 6 näher erläutert. Sie ist mit einem Steuergerät 8 verbunden, das den Meßablauf steuert und die Meßwerte verarbeitet.

[0039] Fig. 2 zeigt einen Schnitt durch eine konventionelle Mikrotiterplatte, und soll dazu dienen, das Meßprinzip besser verständlich zu machen. Dabei ist ein Längsschnitt durch eine Vertiefung 2 einer Mikrotiterplatte 1 dargestellt. Die Vertiefung 2 weist eine Wandung 9 auf, die senkrecht zur Ebene der Unterseite 4 und damit parallel zur Richtung verläuft, in der die Bestrahlung durch die Anregungs- und Detektionseinheit 7 erfolgt. Der Boden 10 der Vertiefung 2 liegt parallel zur Unterseite 4 der Mikrotiterplatte. In der Vertiefung 2 befindet sich eine Lösung 11, die Fluorophore enthält, die in am Boden 10 befestigte Zellen 13 eindringen. Dieser Vorgang hängt von zu erfassenden Eigenschaften der

Zellen 13 ab. Jedoch dringen nicht alle Fluorophore in die Zellen 13 ein, ein Teil verbleibt als überschüssige Fluorophore 14 in dem Teil der Lösung 11, der über die Zellen 13 übersteht.

[0040] Die Anregungs- und Detektionseinheit 7 beaufschlagt die Zellen 13 nun von der Unterseite 4 her mit Anregungslicht 15, das zwischen Unterseite 4 und Boden 10 der Vertiefung 2 durch das Material der Mikrotiterplatte hindurchtritt und die Fluorophore in den Zellen 13 zur Emission von Fluoreszenzstrahlung anregt. Die Zellen 13 befinden sich nur in einer dünnen Schicht am Boden 10, so daß sie das Anregungslicht 15 nicht vollständig absorbieren. Dies ist auch unter dem Gesichtspunkt, daß eine möglichst vollständige Anregung der in den Zellen 13 befindlichen Fluorophore erforderlich ist, gar nicht anders erwünscht. Deshalb werden unvermeidlich auch die überschüssigen Fluorophore 14 angeregt, da die Anregungsstrahlung 15 von der Anregungs- und Detektionseinheit 7 in der Richtung 16 eingekoppelt wird und damit auch die gesamte Lösung 11 durchstrahlt.

[0041] Die Anregungs- und Detektionseinheit 7 nimmt weiter entlang der Richtung 16 aus der Vertiefung 2 austretende Fluoreszenzstrahlung auf. Um dabei Störungen durch benachbarte Vertiefungen 2 (in Fig. 2 nicht dargestellt) zu vermeiden, ist an der Unterseite 4 eine Maske 17 angebracht, die lediglich im Bereich des Bodens 10 offen ist. Somit nimmt die Anregungs- und Detektionseinheit 7 nur im Bereich eines Bodens 10 einer Vertiefung 2 von der Unterseite 4 Strahlung auf.

[0042] Dabei gelangt zum einen Fluoreszenzstrahlung von den Zellen 13 zur Anregungs- und Detektionseinheit 7. Sie stellt das gewünschte Meßsignal dar. Zum anderen erfaßt die Einheit 7 aber auch Fluoreszenzstrahlung von den ebenfalls angeregten Fluorophoren 14.

[0043] Die von den überschüssigen Fluorophoren 14 herührende Fluoreszenzstrahlung stellt einen unerwünschten Störhintergrund dar, da sie nicht mit der Aufnahme von Fluorophoren in die Zellen 13 verknüpft ist.

[0044] Die in Fig. 3 dargestellte Mikrotiterplatte 1 erlaubt nun diesen Störhintergrund ohne Veränderungen am Lesegerät 5 zu reduzieren. Dabei entspricht die Mikrotiterplatte der Fig. 3 im wesentlichen der in Fig. 2 dargestellten Mikrotiterplatte. Allerdings verläuft die Wandung 9 nunmehr entlang einer Achse, die schräg zur Richtung 16 liegt, welche senkrecht auf der Ebene der Unterseite 4 steht. Die Wandung 9 steht damit über den Boden 10 über. Von der Öffnung der Vertiefung 2 her gesehen (senkrecht zur Ebene der Unterseite) weist die Vertiefung 2 somit eine Hinterschneidung auf.

[0045] Dadurch wird der Innenraum der Vertiefung 2 nur noch teilweise von Anregungsstrahlung 15 durchdrungen. Ein erheblicher Teil der überstehenden Lösung 11 befindet sich außerhalb einer Schattenkante 18, die durch die Projektion der Kante der Maske 17 entlang der Richtung 16 gegeben ist. Die außerhalb der Schattenkante 18 liegenden Fluorophore 14 werden nicht zur Fluoreszenz angeregt. Sie können auch keine Fluoreszenzstrahlung zur Anregungs- und Detektionseinheit 7 abgeben, da außerhalb der Schattenkante 18 liegende Bereiche gar nicht auf Fluoreszenzstrahlung hin abgefühlt werden können. Stattdessen trifft die Anregungsstrahlung auf nicht anregbares Plattenmaterial. Somit tragen nur noch wenige restliche Fluorophore 19 zu einem Störhintergrund bei. Das Signal/Rauschverhältnis ist durch die schräge Wandung 9 der Mikrotiterplatte 1 stark verbessert.

[0046] Die Schattenkante 18 wird in der Ausführungsform der Fig. 3 durch die auf die Unterseite 4 aufgebrachte Maske 17 bewirkt. In einer alternativen Ausführungsform ist die

Maske 17 Teil des Lesegeräts 5. Dies hat den Vorteil, daß die Herstellung der Mikrotiterplatte 1 einfacher ist. In einer weiteren alternativen Ausführungsform sind die Wandungen 9 aller Vertiefungen 2 untransparent für Anregungs- und/oder Fluoreszenzstrahlung. Bei einer etwas vereinfachten Bauweise ist die Wandung 9, beispielsweise durch Aufrauhung oder Markierung, opak für Fluoreszenzstrahlung ausgebildet. Dadurch ergibt sich ebenfalls eine merkliche Störsignalunterdrückung.

[0047] Fig. 4 zeigt eine Mikrotiterplatte mit schrägen Vertiefungen 2, die nun in einer Richtung 16 schräg zur Ebene der Unterseite 4 bestrahlt bzw. ausgelesen wird. Hierbei enthält man eine nochmalige Verringerung der Anzahl derjenigen Fluorophore 19, die störende Hintergrundstrahlung emittieren können, da durch den gegenläufigen Schrägverlauf von Wandung 9 und Anregungs- und/oder Detektionsrichtung 16 das Volumen der Vertiefung 2, das von der Anregungsstrahlung durchstrahlt wird, nochmals verringert wird. Die Schattenkante 18 verläuft in der Ausführungsform der Fig. 4 wiederum parallel zur Richtung 16, steht somit nun nicht mehr senkrecht zur Ebene der Unterseite 4.

[0048] Fig. 5 zeigt ähnlich der Fig. 3 eine Mikrotiterplatte in Teilschnittdarstellung. Elemente, die denen der Fig. 3 entsprechen, sind dabei mit den gleichen Bezugszeichen versehen. Die Mikrotiterplatte 1 der Fig. 5 ist zweiteilig aufgebaut und besteht aus einem Oberteil 1a sowie einem Unterteil 1b. Im Unterteil 1b ist eine zylindrische Vertiefung gebildet, im Oberteil 1a ein zylindrisches Durchgangsloch, wobei die Querschnittsform der zylindrischen Vertiefung im Unterteil 1b der des zylindrischen Durchgangsloches im Oberteil 1a entspricht. Das Oberteil 1a ist so auf das Unterteil 1b gesetzt, daß die jeweiligen Zylinderachsen nicht zusammenfallen, sondern gegeneinander versetzt sind. Der Versatz ist geringer als der kleinste Zylinderradius des zylindrischen Durchgangsloches bzw. der zylindrischen Vertiefung. Die zweiteilige Bauweise der Platte 1 ermöglicht eine einfache Herstellung.

[0049] Durch den Versatz der Zylinderachsen weist die Vertiefung 2 zwei unterschiedliche zylindrische Bereiche auf, die senkrecht zum Boden 10 gesehen jedoch nicht direkt übereinanderliegen. Dadurch krägt die Wandung im Bereich des Oberteils 1a der Mikrotiterplatte 1 über den Boden 10 über. Durch die derart durch überstehende Wandung gebildete Hinterschneidung ist das Volumen an überstehender Lösung 11, das von der Anregungsstrahlung 15 erfaßt bzw. das Fluoreszenzstrahlung liefern kann, stark vermindert. Die überschüssigen Fluorophore 19 können damit nur in deutlich geringerem Maß als bei einer Mikrotiterplatte gemäß Fig. 2 zu störendem Hintergrundsignal beitragen.

[0050] Fig. 6 zeigt den prinzipiellen Aufbau der Anregungs- und Detektionseinheit 7 des Lesegeräts 5. Dabei ist die Mikrotiterplatte 1 nur teilweise dargestellt; es ist lediglich die Unterseite 4 im Bereich eines Bodens 10 einer Vertiefung 2 gezeichnet. Die Anregungs- und Detektionseinheit 7 weist eine Strahlungsquelle 20 auf, beispielsweise einen Laser oder eine Weißlichtquelle, z. B. eine Metallhalidlampe. Bei einer Weißlichtquelle kann durch Anwendung geeigneter Filter die Anregungswellenlänge eingestellt werden.

[0051] Eine Optik 21 richtet das Licht von der Strahlungsquelle 20 in einer Bestrahlungsrichtung 22 auf die Unterseite 4 der Mikrotiterplatte. Dort wird es von der Maske 17, die in diesem Fall jedoch Bestandteil der Anregungs- und Detektionseinheit 7 ist, so ausgeblendet, daß lediglich der Boden 10 der jeweiligen Vertiefungen 2 bestrahlt wird, auf dem sich Zellen 13 befinden. Diese emittieren Fluoreszenzstrahlungen 23, welche durch strichpunktierte Linien dargestellt sind.

[0052] Im Strahlengang befindet sich ein Strahlteiler 24, der das Fluoreszenzlicht abteilt, das eine andere spektrale Zusammensetzung als die Anregungsstrahlung 15 hat.

[0053] Die derart abgetrennte Fluoreszenzstrahlung 23 fällt auf einen Detektor 25, bei dem es sich in der dargestellten Ausführungsform um eine CCD-Kamera handelt, die eine Auflösung der einzelnen Vertiefungen ermöglicht und dazu mit dem Steuergerät 8 verbunden ist. Alternativ kann jeder bei der Wellenlänge der Fluoreszenzstrahlung 23 empfindliche Fotodetektor verwendet werden, beispielsweise ein PMT.

[0054] Die Fig. 7 bis 22 zeigen schematisch weitere mögliche Längsschnitte für Vertiefungen 2. Diese sind sämtlich so gestaltet, daß bei senkrecht auf den Boden einfallender Anregungsstrahlung ein Teil der Strahlung auf Mikrotiterplattenmaterial fällt. Dadurch ist das Volumen an überstehender Lösung, die störende Hintergrundstrahlung liefern kann, gegenüber konventionellen Bauweisen mit über die Höhe der Vertiefung durchgehend senkrechter Wandung stark vermindert. Dies gilt auch für die Formen gemäß Fig. 7, 8, 12, 13, 14 und 15 bei denen zwar das Vertiefungsvolumen vollständig von Anregungsstrahlung erfaßt werden kann, jedoch das Volumen gegenüber den erwähnten konventionellen Bauweisen durch die Hinterschneidung reduziert ist.

[0055] Die Formen gemäß Fig. 9, 10, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 21 und 22 haben den Vorteil, daß das Vertiefungsvolumen bei senkrecht auf den Boden von unten eingestrahelter Anregungsstrahlung nur zum Teil durchstrahlt wird. Hier tritt die anhand Fig. 3 geschilderte Wirkung der Schattenkante auf.

[0056] Die in Fig. 7 bis 22 dargestellten Bauformen sind einfach herstellbar, insbesondere, wenn die Mikrotiterplatte, wie zu Fig. 5 erläutert, mehrstückig aufgebaut ist.

Patentansprüche

1. Mikrotiterplatte mit einer Oberseite (3), einer gegenüberliegenden Unterseite (4) und mehreren in die Oberseite eingelassenen Vertiefungen (2), die jeweils von mindestens einer Wandung (9) und einem Boden (10) begrenzt werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß von der Oberseite (3) in Richtung auf den Boden (10) gesehen jede Vertiefung (2) mindestens abschnittsweise eine oder mehrere Hinterschneidungen aufweist.
2. Mikrotiterplatte nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Vertiefungen (2), deren Innenraum zumindest abschnittsweise zylindrisch ist, insbesondere die Form eines Kreiszylinders hat, wobei die Zylinderachse schräg zur Ebene der Unterseite (4) liegt.
3. Mikrotiterplatte nach einem der obigen Ansprüche, gekennzeichnet durch eine an der Unterseite (4) angebrachte Maske (17), die im Bereich der Böden (10) der Vertiefungen (2) strahlungstransmittierend ist.
4. Mikrotiterplatte nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Wandung (9) sich längs einer Mittelachse erstreckt, die unter einem Winkel zwischen 10° und 80° zur Ebene der Unterseite (4) liegt.
5. Mikrotiterplatte nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Oberfläche (3) gebildete Öffnung jeder Vertiefung (2) senkrecht zu einer Ebene der Unterseite (4) gesehen über dem Boden (10) liegt.
6. Mikrotiterplatte nach einem der obigen Ansprüche, gekennzeichnet durch einen keilförmigen Grundkörper.
7. Mikrotiterplatte nach einem der obigen Ansprüche,

gekennzeichnet durch einen unter einem Winkel ungleich 90° zu einer Ebene der Unterseite (4) verlaufenden Wandungsabschnitt, der direkt an den Boden (10) angrenzt.

8. Mikrotiterplatte nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in die Unterseite (4) Vertiefungen eingearbeitet sind. 5

9. Mikrotiterplatte nach Anspruch 8, gekennzeichnet durch eine an der Unterseite (4) angeordnete Prismenstruktur. 10

10. Mikrotiterplatte nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch mindestens zwei übereinanderliegende zylindrische Vertiefungsbereiche, deren Zylinderachsen zueinander versetzt sind.

11. Mikrotiterplatte nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch mindestens zwei übereinanderliegende zylindrische Vertiefungsbereiche, die unterschiedlichen Querschnitt aufweisen. 15

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

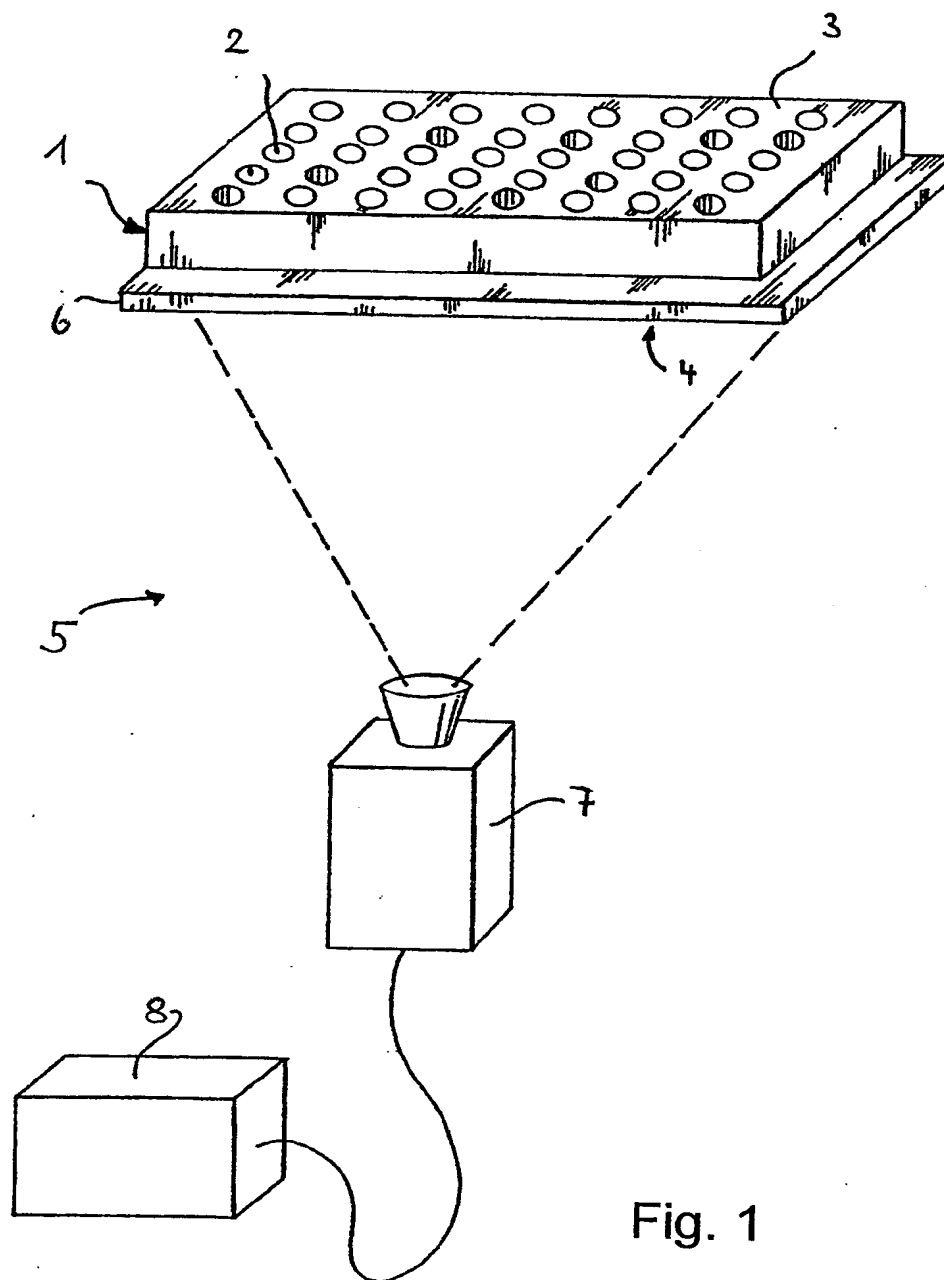
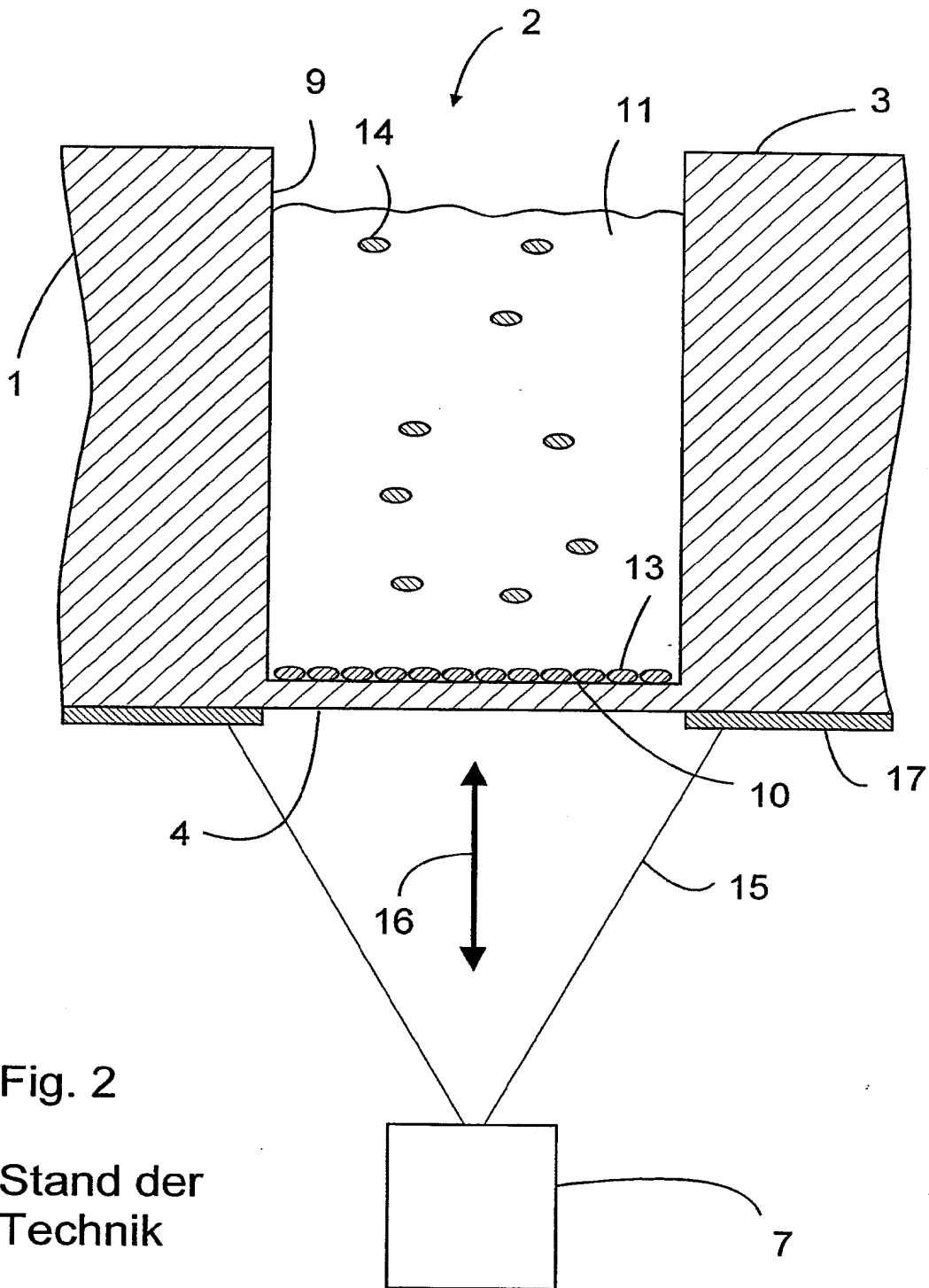


Fig. 1



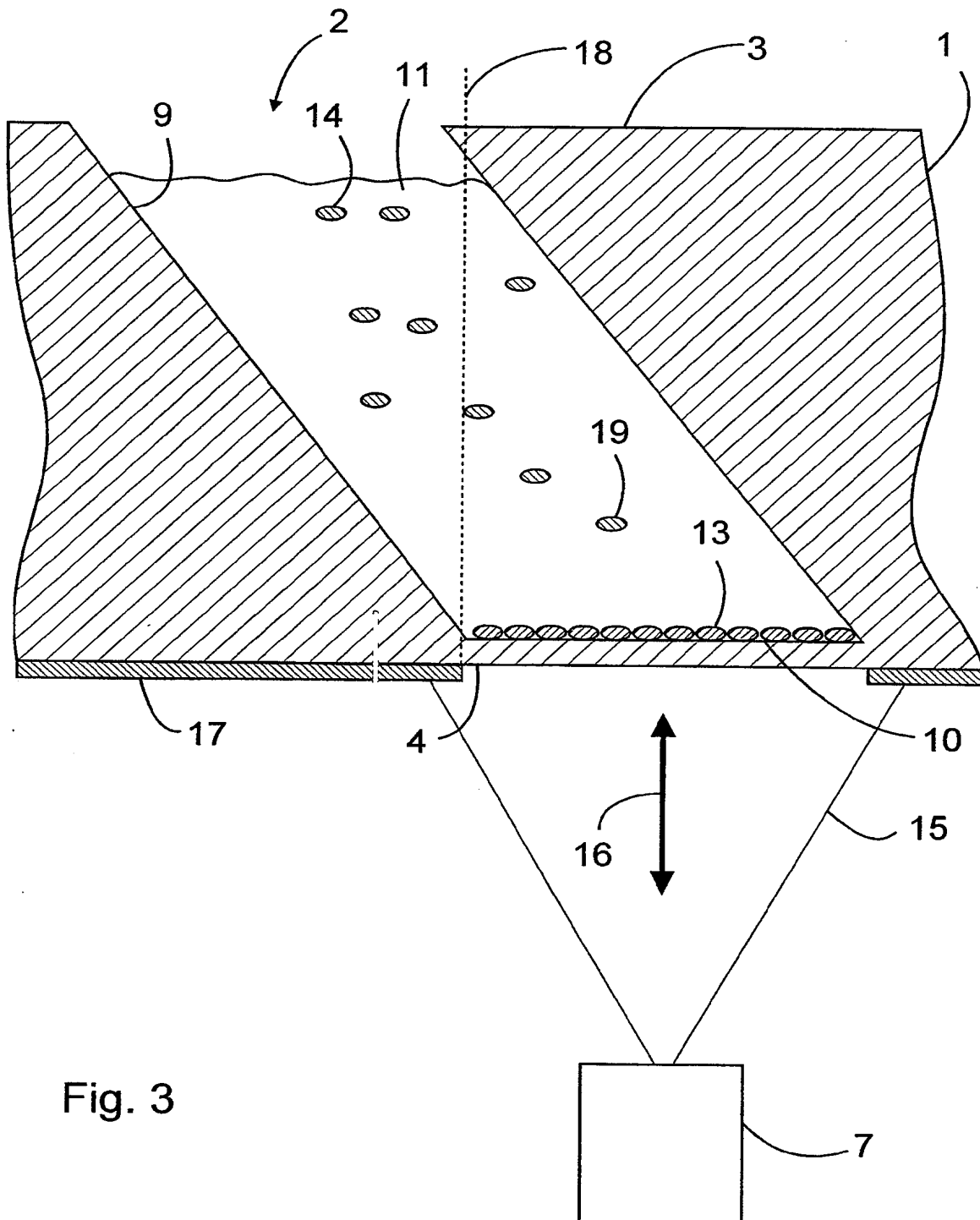


Fig. 3

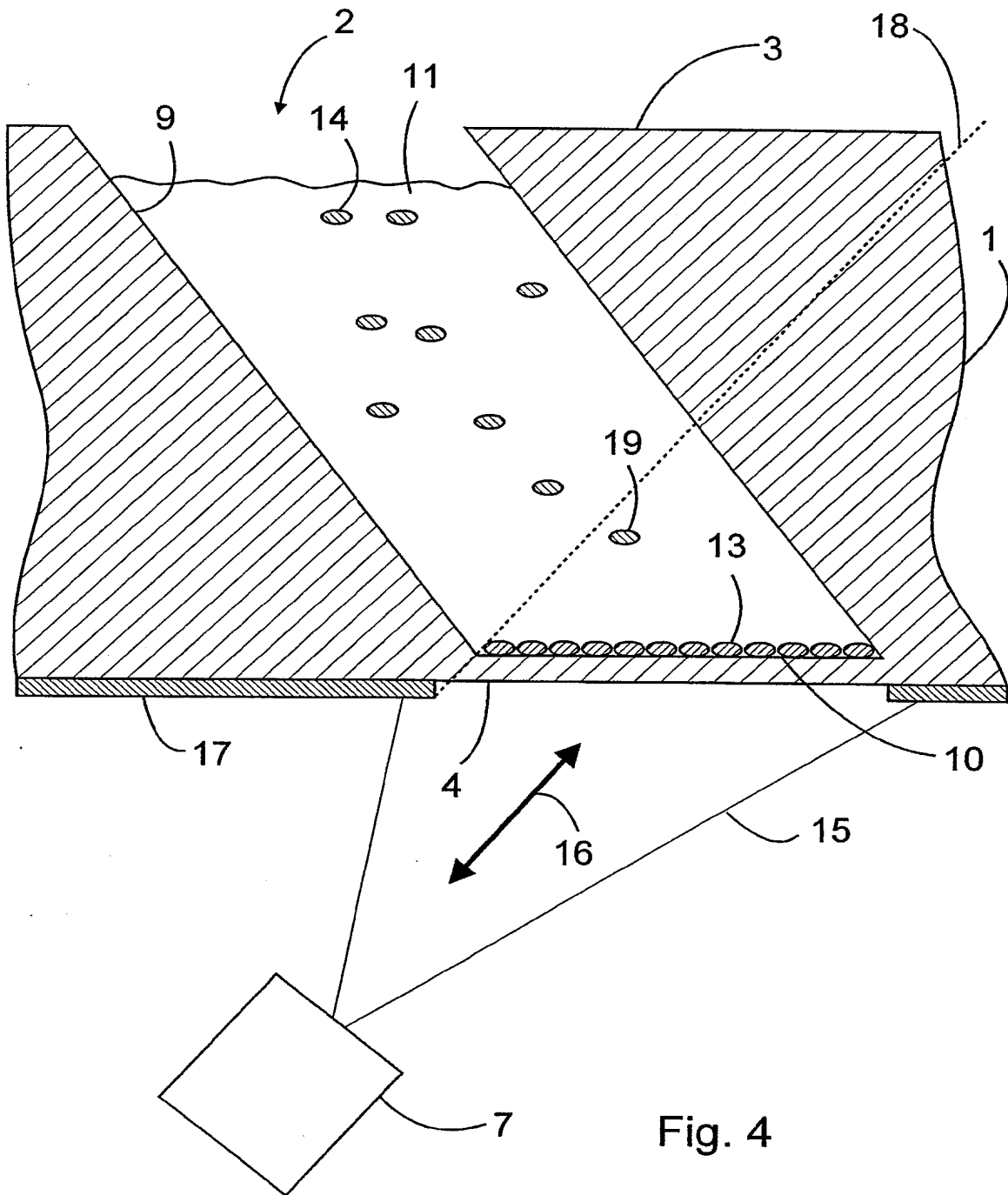


Fig. 4

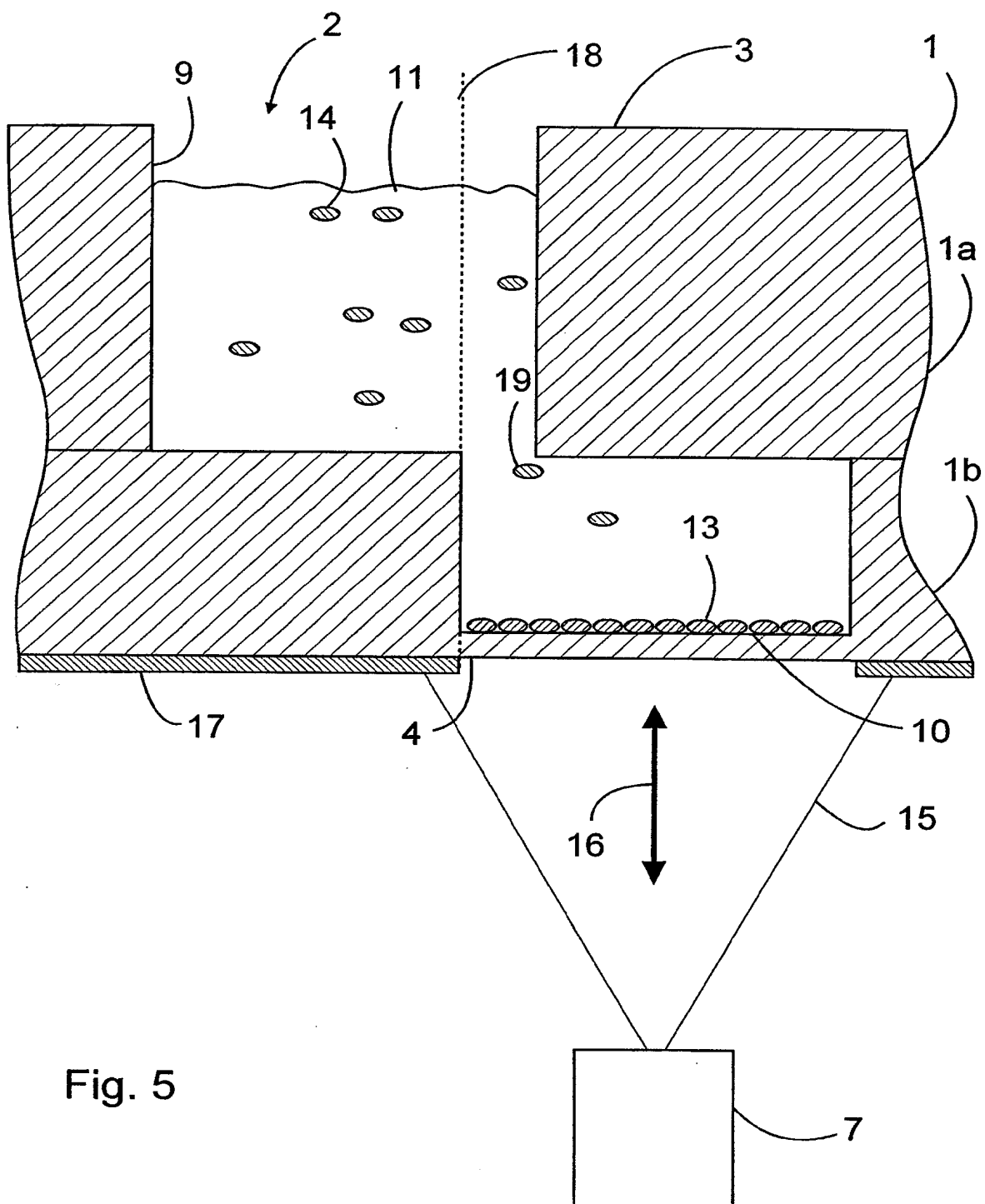


Fig. 5

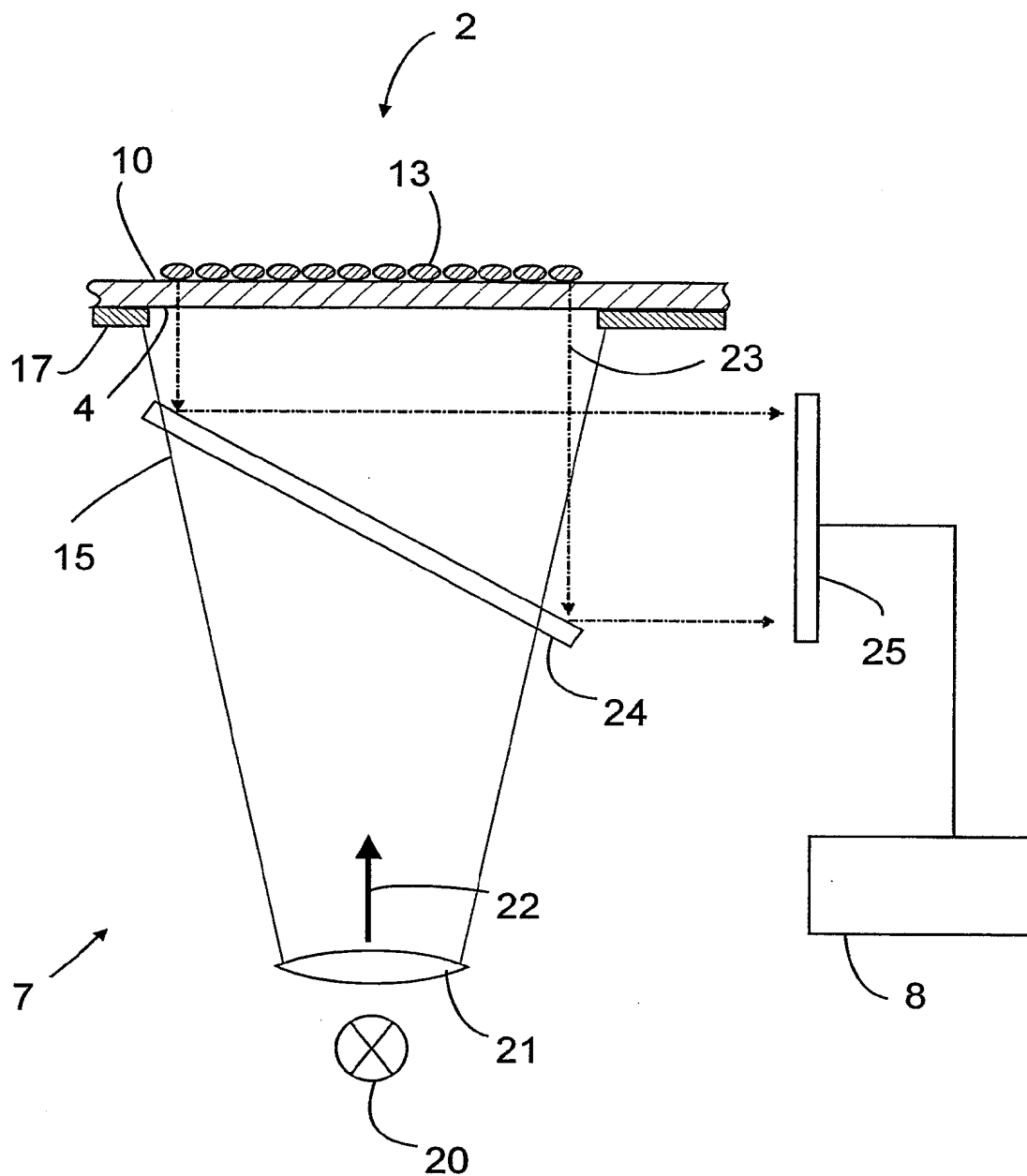


Fig. 6

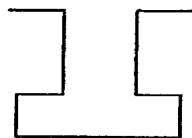


Fig. 7

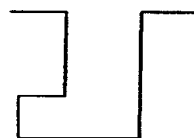


Fig. 8

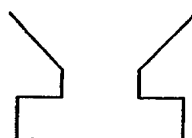


Fig. 9

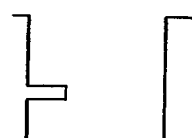


Fig. 10

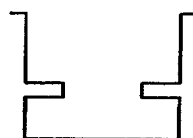


Fig. 11

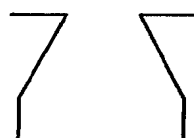


Fig. 12

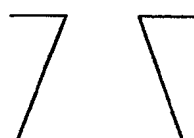


Fig. 13

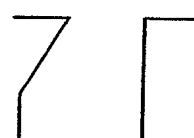


Fig. 14

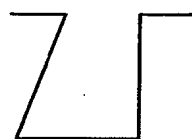


Fig. 15

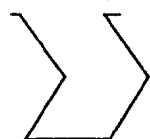


Fig. 16



Fig. 17

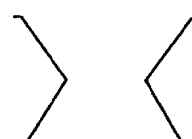


Fig. 18

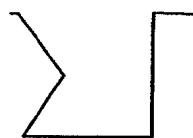


Fig. 19



Fig. 20

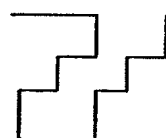


Fig. 21

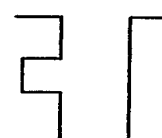


Fig. 22